

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE
ACRIDINORANGE-FLUORESZENZFÄRBEMETHODE
BEI DER SUCHE NACH TUMORZELLEN IM STRÖMENDEN BLUT

VON

Pál Bölcskei

1965

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE
ACRIDINORANGE-FLUORESZENZFÄRBEMETHODE
BEI DER SUCHE NACH TUMORZELLEN IM STRÖMENDEN BLUT

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg - Universität Mainz

vorgelegt von

Pál Bölcskei

aus Budapest

MAINZ 1963

Dekan: Professor Dr. G. W. Korting
Referent: Professor Dr. med Lothar Diethelm
Tag der mündl. Prüfung: 26. Mai 1965

Gesamtherstellung: Ditters Bürodienst Mainz

EINFÜHRUNG

Die Einführung der Zytodiagnostik durch PAPANICOLAOU war ein signifikanter Beitrag für die Frühdiagnostik maligner Tumoren und eine wesentliche Erweiterung der histopathologischen Untersuchungsmethoden, die noch immer die fundamentalen diagnostischen Maßnahmen sind.

Die Färbemethode nach PAPANICOLAOU ist jedoch nicht einfach und erfordert einen erheblichen Zeitaufwand und geschulte Kräfte sowohl für die Färbung als auch für die Untersuchung der Präparate. Aus diesen Gründen wurden bei der Suche nach einer einfacheren, schnelleren und wenigstens ebenso genauen Methode für die exfoliative Zytologie keine Mühen gescheut.

Durch unermüdliche Anstrengungen gelang es SCHÜMMELFEDER und Mitarbeitern schon 1948, die zytoplasmatische RNS in einem einfachen Verfahren eindrucksvoll mit Hilfe der Acridinorange-Färbung darzustellen (47, 50).

SCHÜMMELFEDER gehörte zu den ersten, die darauf hinwiesen, daß Tumorzellen mit Hilfe von Acridinorange viel besser als mit den konventionellen Färbeverfahren zur Darstellung gebracht werden können.

Diese Beobachtungen, in Verbindung mit den fundamentalen Untersuchungen von CASPETSON (9) über die Funktion der Nukleinsäuren bei Zellwachstum und Zellteilung führten zur Anwendung der Acridinorange-Färbetechnik in der Zytodiagnostik.

Die erst kürzlich durch v.BERTALANFFY und BERTALANFFY (3, 4) in der Zytodiagnostik eingeführte Fluorochromierung mit Acridinorange versprach größere Anwendbarkeit in der klinischen Praxis, da diese Methode schneller und einfacher in der Handhabung ist als die Färbemethode nach PAPANICOLAOU. Außerdem ist bei der erstgenannten Methode die charakteristische Fluoreszenz nukleinsäurereicher Zellen besonders auffallend, eine Tatsache, die schon früher von SCHÜMMELFEDER (47, 50) festgestellt wurde.

v.BERTALANFFY und BERTALANFFY (5, 6) berichteten 1961, daß die Acridinorange-Fluoreszenzmethode an etwa 50.000 Fällen in 25 Laboratorien der Vereinigten Staaten und Kanadas getestet und mit der Standardmethode nach PAPANICOLAOU verglichen wurde. Die Testergebnisse wurden in vielen Fällen histologisch gesichert, und die statistische Auswertung der Versuche war eindrucksvoll. Es zeigte sich nämlich, daß die Fluorochromierung mit Acridinorange genauso zuverlässige Ergebnisse liefert wie die Färbung nach PAPA-

NICOLAOU. Möglicherweise ist sie dieser sogar vorzuziehen, da sie schneller und einfacher ausgeführt werden kann.

Trotzdem erhob sich, auf Grund anderer Untersuchungen (13, 14, 51) die Frage, ob diese Methode Eingang in die Zytodiagnostik des Krebses finden kann. Besondere Beachtung verdient die Arbeit von SCHÜMMELFEDER und Mitarbeitern (47, 50), die die Acridinorange-Methode mit der Standardmethode von PAPANICOLAOU bei gynäkologischen Tumoren verglichen. Während die obengenannten Autoren prinzipiell der Ansicht von v.BERTALANFFY und BERTALANFFY beipflichten, heben sie doch hervor, daß das sogenannte "Warnzeichen", das von v.BERTALANFFY und BERTALANFFY stark akzentuiert wird, nicht für alle Tumoren und besonders nicht für die gynäkologischen Karzinome charakteristisch ist.

SCHÜMMELFEDER und Mitarbeiter berichten über ihre Untersuchungen (50), die in Einklang mit denen von DART und TURNER (13) stehen und die zeigen, daß für diagnostische Zwecke die gleichen morphologischen Kriterien wie bei der Färbemethode nach PAPANICOLAOU berücksichtigt werden müssen.

Sie fassen ihre Ergebnisse wie folgt zusammen:

"Trotz einiger methodischer Vorzüge der Acridinorange-Fluorochromierung hat es sich für uns nicht als praktisch erwiesen, in der Routine-Diagnostik die PAPANICOLAOU-Färbung durch das fluoreszenzmikroskopische Verfahren zu ersetzen."

Einen anderen Vorteil sieht SCHÜMMELFEDER (50) in dieser Methode, denn "so kann z.B. mit diesem Verfahren experimentell in einfacher Weise der Weg und das Schicksal in die Blutbahn eingebrachter nukleinsäurereicher Tumorzellen verfolgt werden." Die Suche nach Tumorzellen im strömenden Blut würde, wenn durchführbar, größere Möglichkeiten für die Diagnostik bösartiger Tumoren, unabhängig von deren Lokalisation, bieten. Außerdem könnten dann auch therapeutische Effekte untersucht werden.

Der zweifache Grund dieser Untersuchung ist also, eine kritische Bewertung der Acridinorange-Färbung vorzunehmen und ihre Verwendbarkeit bei der Suche nach Tumorzellen im strömenden Blut zu prüfen.

Biochemische Grundlagen der Acridinorange-Färbemethode

Es ist heute allgemein bekannt, daß die Nukleinsäuren der Zelle (Desoxyribonukleinsäure DNS und Ribonukleinsäure RNS) eine entscheidende Rolle in der Eiweißsynthese spielen (1, 9, 10, 18, 37, 46) und natürlich auch beim Wachstum normaler und maligner Zellen beteiligt sind. Die DNS der Chromosomen stellt das Material der Gene, die das erblich festgelegte Stoffwechselgeschehen der Zelle beherrscht und ist in somatischen Zellen konstant unabhängig von der Art des Gewebes. Die RNS von Kern und Zytoplasma ist für die Eiweißsynthese und damit für das Zellwachstum verantwortlich. Während der Gehalt der Zelle an DNS konstant bleibt, variiert ihr RNS-Gehalt je nach der Stoffwechselaktivität. Zellen mit normalerweise hoher Stoffwechselaktivität wie z.B. sezernierende, proliferierende, regenerierende und ähnliche Zellen sind durch einen hohen RNS-Gehalt des Zytoplasmas charakterisiert. Dies trifft in besonderem Maße für bösartige Zellen zu. Der hohe zytoplasmatische RNS-Gehalt wird auch bei vielen anderen Färbemethoden durch eine Basophilie des Zytoplasmas demonstriert (3, 26, 34). In dieser Hinsicht basiert die Fluorochromierung mit Acridinorange auf dem gleichen histochemischen Prinzip wie z.B. die Färbungen nach PAPANICOLAOU oder PAPENHEIM. Mit Hilfe der Acridinorange-Methode besteht aber auch die Möglichkeit, die Nukleinsäure des Kerns von der des Protoplasmas zu unterscheiden. Die DNS des Kerns erscheint als gelbe oder hellgrüne Fluoreszenz, während die RNS des Zytoplasmas braun, orange oder leuchtend rot, je nach der Konzentration der RNS, erscheint.

Proliferierende Tumorzellen z.B. zeigen eine flammend rote Fluoreszenz.

Gründe für die Suche nach Tumorzellen im strömenden Blut

Schon vor 100 Jahren beobachtete VIRCHOW (19) den Einbruch von Krebszellen in die Blut- und Lymphbahnen. Die Möglichkeit, Tumordiagnostik mit Hilfe des strömenden Blutes zu betreiben, wurde erstmalig 1869 von ASHWORTH (11, 43) in Erwägung gezogen, der bei der Autopsie eines Patienten, der an einem bösartigen Hauttumor gestorben war, Zellen im Blut fand, die denen des Hauttumors ähnlich waren. 1897 machte GOLDMAN (19) die Beobachtung, daß im venösen Blut häufiger als im arteriellen maligne Zellen zu finden waren.

Lange galt es als Tatsache, daß Tumorzellen das Kapillarsystem der Lunge nur bis zu einer Größe von 8μ passieren können und daß größere Zellen in

Form von Embolien in der Lunge festgehalten würden (19, 45).

1958 fand CAIN (8) eine Erklärung für das Vorhandensein von Tumorzellen im zirkulierenden Blut, die schon damals von mehreren Untersuchern in Größen von 10 - 46 μ aus dem zirkulierenden Blut isoliert worden waren. Nach seiner Darstellung führt die Embolisierung von kleinen Ästen der Arteria pulmonalis zur Druckerhöhung im kleinen Kreislauf, die durch die sogenannten "Sperrarterien" zwischen der Arteria pulmonalis und der Arteria bronchialis ausgeglichen wird. Äste dieser Sperrarterien können, unter Umgehung des Kapillarsystems der Lunge, das Blut und damit auch Tumorzellen direkt in die Aorta führen.

Eines der Hauptprobleme bei der Suche nach Tumorzellen im strömenden Blut besteht in der Einengung und Trennung der Tumorzellen von den verschiedenen Zellelementen des Blutes.

Neuere Untersuchungen (38, 43, 45) unterstreichen die Wichtigkeit dieser Phase, denn in 5 - 20 ml Blut von Patienten im fortgeschrittenen Stadium der Krebskrankheit lassen sich höchstens einige Hundert Tumorzellen mit Hilfe einer verbesserten quantitativen Technik finden.

Verschiedene Anreicherungs- und Trennungsmethoden wurden entwickelt (21). Mit Hilfe physiko-chemischer Mittel, nämlich mit Saponin (17, 33, 36), Essigsäure oder Aqua dest. wurde die Hämolyse der Erythrozyten vorgenommen, während die Zytolyse der Leukozyten mit Streptolysin-0 (38, 43) erreicht wurde. Die Tumorzellen bleiben bei den genannten Prozeduren intakt. Nach der Hämolyse der Erythrozyten und der Zytolyse der Leukozyten wurden die Tumorzellen quantitativ aus der Blutprobe filtriert.

In jüngerer Zeit wurden Trennungsmethoden, die auf dem unterschiedlichen spezifischen Gewicht der verschiedenen Zellarten beruhen, entwickelt.

Nach der von SANDBERG und MOORE (41) angegebenen Methode bleibt die mit Heparin und Fibrinogen versetzte Blutprobe zwecks Sedimentation der Erythrozyten stehen. Das überstehende Plasma wird zentrifugiert. Von dem so erhaltenen Sediment, das Leukozyten und Tumorzellen enthält, werden die Ausstriche angefertigt.

ROBERTS und COLE (39) geben für die Sedimentation der Erythrozyten eine ähnliche Methode an. Sie versetzen vor dem Zentrifugieren das Plasma mit einem Bovine-Albumin mit genau eingestelltem spezifischem Gewicht von 1,065. Da die Tumorzellen leichter sind als die zugegebene Albumin-Lösung, sammeln sie sich nach dem Zentrifugieren in der zwischen Plasma

und Albumin gelegenen Schicht. Sie werden aus dieser Schicht aspiriert, mit Kochsalzlösung ausgewaschen und dann ausgestrichen. Die Leukozyten setzen sich am Boden des Zentrifugenglases ab.

Für unsere Untersuchungen wählten wir die von GRAEBER (11, 21, 22, 23) entwickelte Methode, die eine Modifikation der von SEAL ausgearbeiteten ist. Bei dieser Methode wird Periston als Blutverdünnungsflüssigkeit und eine Silikonölmischung als Trennungsflüssigkeit gebraucht.

DIE ACRIDINORANGE - FÄRBEMETHODE

Die Acridinorange-Färbung nach von BERTALANFFY und BERTALANFFY wird folgendermaßen ausgeführt:

Benötigte Reagenzien:

1. Fixierflüssigkeit - Alkohol-Äthergemisch
95% Äthylalkohol + Äthyläther 1:1
2. Alkohol-Lösungen - 80%, 70% und 50% Äthylalkohol in
Aqua dest.
3. Essigsäurelösung - 1% Essigsäure in Aqua dest.
4. Phosphatpufferlösung - Stammlösung A (1/15 m)
pH 6,0 9,465 g Na_2HPO_4 / 1 l Aqua dest.
Stammlösung B (1/15 m)
9,072 g KH_2PO_4 / 1 l Aqua dest.

Um eine Lösung vom pH-Wert 6,0 zu erhalten, mischt man 230 ml der Stammlösung A mit 40 ml der Stammlösung B. Der pH-Wert wird mit Hilfe des pH-Meters gemessen und eingestellt.

5. Acridinorange-Färbelösung 0,01%
Stammlösung 0,1% Acridinorange in Aqua dest.
Die Färbelösung wird durch Verdünnung von 10 ml der Stammlösung auf 100 ml Phosphatpuffer pH 6,0 gewonnen.
6. Calciumchloridlösung (0,1 m)
11,099 g CaCl_2 / 1 l Aqua dest.

Färbevorgang

1. Fixieren: Frische Ausstriche werden wenigstens 5 min. im Äther-Alkoholgemisch fixiert. Es wurde festgestellt, daß bei der Fixation vorher luftgetrockneter Ausstriche der Zellabfluß bei den nachfolgenden Vorgängen nicht so groß war.

2. Wässern: Nach der Fixation werden die Präparate zum Wässern durch die absteigende Alkoholreihe (80%, 70% und 50%), 1% Essigsäure und Aqua dest. geführt. Dieser Vorgang dauert etwa 1 Minute. Die Objektträger werden so oft in die verschiedenen Lösungen eingetaucht, bis die Flüssigkeit ohne Streifenbildung von ihnen abfließt.

3. Färben: Daran anschließend kommen die Präparate für 3 min in die 0,01-%ige Acridinorange-Farblösung. Überflüssige Farbe wird 1 min im Phosphatpuffer (pH 6,0) ausgewaschen. Die Präparate können, ohne Schaden zu erleiden, über mehrere Stunden in der Pufferlösung aufbewahrt werden.

4. Differenzieren: Nach dem Phosphatpuffer werden die Ausstriche für 1-2 Minuten in ein Calciumchloridbad gebracht. In dieser Phase geschieht die Differenzierung zwischen der DNS des Kerns und der RNS des Plasmas. Die exakte Differenzierungszeit variiert mit der Dicke der Ausstriche. Sehr dicke Präparate brauchen oft bis zur restlosen Differenzierung etwa 3 Minuten. Wenn das den Kern umgebende Zytoplasma zu stark angefärbt ist, erscheint der Kern nicht grün, sondern gelb oder gar rot. Ein gutes Kriterium für eine genaue Differenzierung bieten die Kerne neutrophiler Leukozyten, die leicht grün erscheinen sollten. Um festzustellen, ob die Differenzierung abgeschlossen ist, können die nassen Präparate schnell unter dem Mikroskop angesehen werden.

Nachdem die Differenzierung zufriedenstellend abgeschlossen ist, werden die Präparate sorgfältig mit Pufferlösung aus einer Spritzflasche abgespült. Die noch nassen Objektträger werden mit einem Deckglas bedeckt und sind für die mikroskopische Untersuchung im ultravioletten Licht fertig.

(Gefärbte und differenzierte Präparate können für mehrere Stunden, ehe sie untersucht werden, in der Pufferlösung aufbewahrt werden.)

Nach der Auswertung der Präparate können diese in 50%igem Alkohol entfärbt und entweder trocken oder im Alkohol-Äther-Fixiergemisch aufbewahrt werden. Sie können später für dieselbe oder jede andere Färbung Verwendung finden.

Wenn eine sehr schnelle Diagnose erwünscht wird, kann das Stadium der Fixation umgangen und sofort mit der Wässerung begonnen werden. Der ganze Färbevorgang, einschließlich der Beurteilung der Präparate, nimmt etwa 20 Minuten in Anspruch.

Die für unsere Untersuchung verwendeten optischen Geräte waren:
1 Leitz Lampengehäuse Nr. 250 mit einer Quecksilberhochdrucklampe und den notwendigen Ultraviolett- und Blaufiltern. Die Untersuchungen wurden im allgemeinen im Blaulicht vorgenommen, das uns auch für die Mikrofotographie besonders zweckmäßig erschien. Diese Geräte wurden in Verbindung mit dem Leitz-Laborlux verwendet.

Trennung der Tumorzellen aus dem Blut

Für die Trennung der Tumorzellen aus dem Blut arbeiteten wir nach der Methode von SEAL, modifiziert von GRAEBER.

MATERIAL UND METHODE

10 ml Rekord-Spritze

Natrium citricum 3,8%

Periston (isotonische Lösung von Polyvinylpyrrolidon oder PVP)

Silikonölgemisch, spezifisches Gewicht 1,075

Laborzentrifuge, 0 - 2000 Umdrehungen/min

Objektträger und Deckgläser

2 ml Natriumcitrat werden in die 10 ml-Spritze aufgezogen und mit 8 ml aus der Kubitalvene entnommenem Patientenblut gemischt. Sofort danach wird das Blut wie folgt aufgearbeitet: 10 ml des Silikonölgemischs, spezifisches Gewicht 1,075, werden vorsichtig, ohne die Seitenwände zu benetzen, in ein 50 ml-Zentrifugenglas gegeben. 20 ml Periston werden langsam über das Silikonöl geschichtet, so daß sich die beiden Flüssigkeiten nicht vermischen. Dann wird das Citratblut mit dem Periston gemischt. Auch dieser Vorgang erfordert Vorsicht, denn es muß vermieden werden, daß Silikonöltröpfchen in das Citratblut-Peristongemisch gelangen. Danach wird 15 min bei 1 500 Umdrehungen/min zentrifugiert, wobei Erythrozyten und Leukozyten, deren spezifisches Gewicht höher als das des Silikonöls ist, getrennt werden. Tumorzellen und Lymphozyten liegen in einer zwischen Silikonöl und Periston-Plasmagemisch sich befindenden Zwischenschicht. Das Periston-Plasmagemisch wird vorsichtig, bis etwa 5 mm über die Tumorzelle-Lymphozytenschicht abgesaugt, und auf die Tumorzellschicht werden behutsam 40 ml Periston zupipettiert. Mit einem Glasstab wird die auf dem Silikonöl aufliegende Tumorzell-Lymphozytenschicht durch vorsichtiges Rühren in das frisch zugegebene Periston gespült. Heftiges Rühren muß vermieden werden,

da der Glasstab mit dem Silikonöl nicht in Berührung kommen darf. Diese Methode ist als die "Flotation Method" bekannt (43).

Die nach dem Umrühren erhaltene Suspension von Tumorzellen und Lymphozyten in Periston wird mit einer Pipette entnommen und bei 800 Umdrehungen/min für 30 Minuten zentrifugiert. Das überstehende Periston wird verworfen und von dem tumorzellhaltigen Sediment werden die Ausstriche angefertigt.

Es gibt zwei Möglichkeiten, Ausstriche zu machen:

1. Kann man die über dem Sediment stehende Flüssigkeit vollständig verwerfen, und mit einem Watteträger das Sediment, das oft verklumpt ist, auf den Objektträger bringen (21).
2. Man läßt einen Rest von etwa 0,5 ml des Peristons über dem Sediment stehen, bringt durch Schütteln das Sediment wieder in Suspension, gibt einen Tropfen auf einen fettfreien Objektträger und streicht mit einem Deckglas aus. Diese Methode erscheint uns vorteilhafter als die erstgenannte, da man gleichmäßig dicke Ausstriche erhalten kann und kein Zellverlust wie beim Arbeiten mit dem Watteträger eintritt. Im Labor hergestellte Mischungen aus Blut und Tumorzellen ließen sich auf diese Weise sehr gut trennen.

Der experimentelle Teil der Untersuchungen wurde mit dem Ehrlich-Aszites-Karzinom der Maus, vermischt mit Rattenblut, Pleura- und Abdominalergüssen von Tumorpatienten vermischt mit dem Blut der jeweiligen Patienten und dem Blut von Tumorpatienten im fortgeschrittenen Stadium der Krankheit durchgeführt. Wir haben jeweils die Acridinorange-Färbemethode und die Trennungsmethode in folgenden Versuchsreihen getestet:

1. Ausstriche von unverdünntem und verdünntem Ehrlich-Aszites-Karzinom der Maus wurden mit Acridinorange gefärbt.
2. Eine bekannte Anzahl von Ehrlich-Aszites-Karzinom-Tumorzellen wurde mit Rattenblut gemischt. Bei dieser Blutprobe mit bekannter Tumorzellkonzentration wurde die Trennung nach SEAL durchgeführt und die Präparate anschließend mit Acridinorange gefärbt.
3. Tumorzellhaltige Ergüsse aus Pleura oder Abdomen wurden mit dem Blut der jeweiligen Patienten gemischt. Die Proben wurden wie beschrieben getrennt und die Präparate mit Acridinorange gefärbt.
4. Das aus der Kubitalvene entnommene Blut von Tumorpatienten im fortgeschrittenen Stadium der Krankheit wurde wie oben bearbeitet und gefärbt. In allen Versuchen wurden Parallelfärbungen nach PAPENHEIM durchgeführt.



Abb.1 Ehrlich-Aszites-Tumor der Maus.
Direktausstrich aus einer verdünnten Aszitesprobe.
Vergrößerung 200 fach

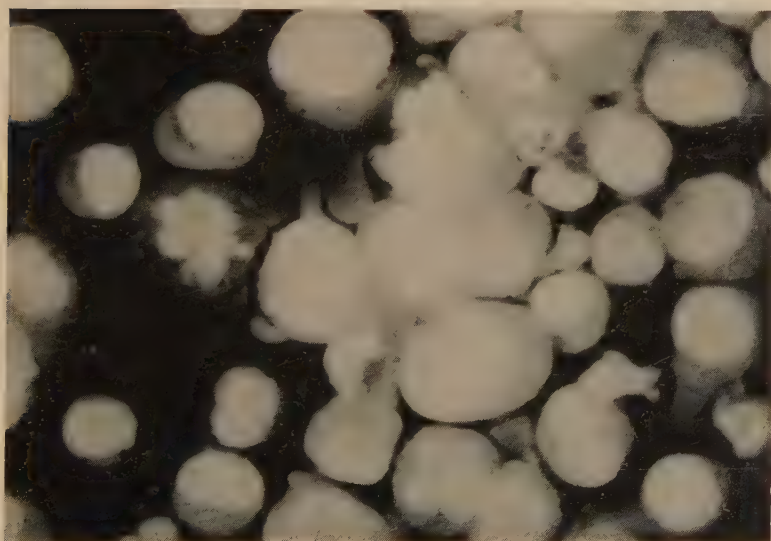


Abb.2 wie oben.
Vergrößerung 500 fach

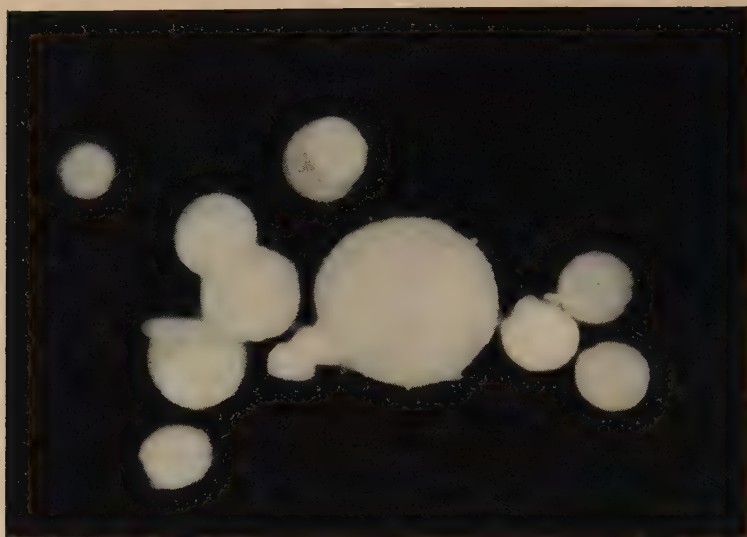


Abb.3 Ehrlich-Aszites-Tumor der Maus.
Nach Trennung aus einer Mischung mit Rattenblut.
Vergrößerung 500 fach

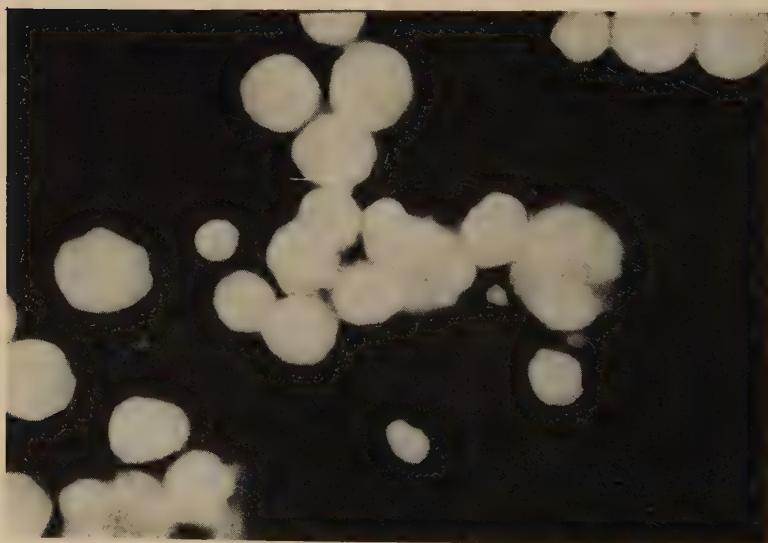


Abb.4 Pleura-Aszites eines Patienten mit Bronchialkarzinom.
Direktusstrich aus dem Aszites sediment.
Vergrößerung 500 fach

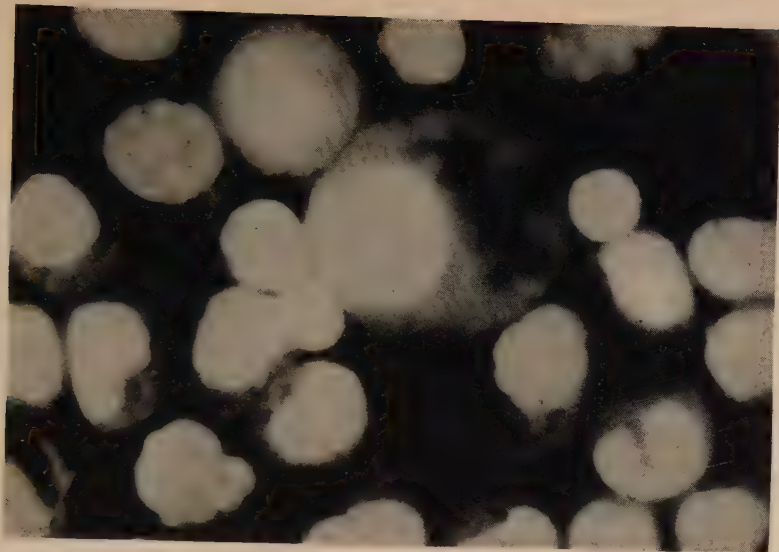


Abb. 5 wie Abb. 4
Vergrößerung 950 fach

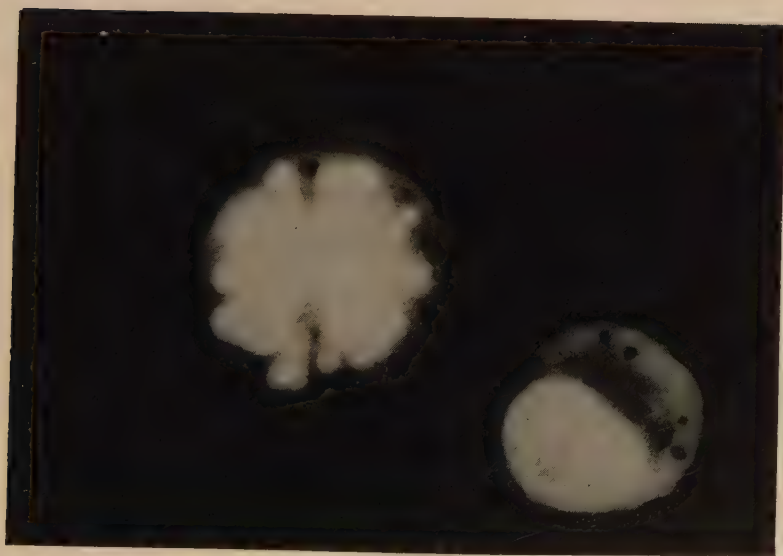


Abb. 6 Pleura-Aszites eines Patienten mit Bronchialkarzinom.
Nach Trennung aus einer Mischung mit
Patientenblut.
Vergrößerung 950 fach

ERGEBNISSE

Ausstriche vom Ehrlich-Aszites-Karzinom der Maus werden mit Acridinorange ausgezeichnet angefärbt. Im Fluoreszenzmikroskop bei blauem oder ultravioletttem Licht verblüffen die Tumorzellen durch ihr flammend rotes Zytoplasma und den grünen oder gelblich-grünen Kern. Details in der Kernstruktur sind oft zu erkennen. Die Kerne der vereinzelt vorhandenen Leukozyten fluoreszieren hellgrün und sind nicht mit den Kernen der Tumorzellen zu verwechseln (Abb.1-2).

Nach der Trennung der Ehrlich-Aszites-Karzinomzellen aus dem Rattenblut mit anschließender Acridinorange-Färbung erhielten wir gleich gute Resultate (Abb.3). Dieser Versuch wurde sehr oft wiederholt, die Resultate waren immer gleich gut, so daß wir sowohl zur Trennungsmethode als auch zur Fluorochromierung mit Acridinorange aus dem Blut isolierter Tumorzellen Vertrauen haben.

Ebenso leicht werden Tumorzellen in Pleura- oder Abdominalergüssen nachgewiesen, und zwar sowohl direkt in den Ergüssen wie auch nach der Trennung der mit Blut vermischten Ergußflüssigkeiten (Abb.4, 5, 6).

Nach diesen Vorversuchen stand es für uns außer Frage, daß wir mit Hilfe der Trennungsmethode und der Färbung in der Lage waren, im peripheren Blut kreisende Tumorzellen nachweisen zu können.

Wir untersuchten 32 Blutproben von Patienten mit metastasierenden Tumoren, alle im fortgeschrittenen Stadium der Krankheit. Es handelte sich um Larynx-, Pharynx-, Lungen- und Abdominaltumoren und Tumoren des weiblichen Urogenitaltraktes. Eine Blutprobe wurde der Kubitalvene eines jeden Patienten entnommen und wie beschrieben aufgearbeitet. In keinem unserer Fälle konnten Tumorzellen aus dem Blut isoliert werden. Wir haben daraufhin die Versuche abgebrochen, da wir auf Grund der Vorversuche zu der Ansicht gelangt waren, dieser Mißerfolg beruhe nicht auf einem Versagen der Trennungs- oder Färbetechnik, sondern allein darauf, daß zum Zeitpunkt der Blutentnahme sich keine Tumorzellen im Blut der untersuchten Patienten befanden (Tab.1). In dieser Tabelle wird die Häufigkeit, mit der von verschiedenen Autoren Tumorzellen im Blut von Patienten mit bekannter Tumorerkrankung gefunden wurden, demonstriert. Es handelte sich um Tumoren verschiedener Art und Lage und unterschiedlichem Krankheitsstadium.

Tabelle 1: Untersuchungsergebnisse verschiedener Autoren bei der Suche nach Tumorzellen im strömenden Blut

Nr. Jahr	Autor	Ort der Blutentnahme	Zahl der untersuchten Fälle	davon pos. in %
1. 1869	Ashworth, T.R.	peripheres Blut		
2. 1903	Schmidt, M.B.	kleine Lungenarterien	(F) 41	in einem Fall 36
3. 1906	Schleip, K.	peripheres Blut		
4. 1919	Markus, H.	peripheres Blut		in zwei Fällen
5. 1921	Quensel, U.	rechter Vorhof	(F) 50	in einem Fall 12
6. + 1931	Jonescu, P.	peripheres Blut +		in mehreren Fällen
7. 1934	Pool, E.H. u. Dunlop, G.R.	Armvenenblut	(F) 40	42
8. 1955	Engell, H.C.	Armvenenblut	93	18
9. 1955	Fischer, E.R. u. Turnbull, R.B.	regionäres Blut	107	53
10. 1955	Grunze, H.	regionäres Blut	25	32
11. 1957	Sandberg, A.A. u. Moore, G.E.	Armvenenblut		
12. 1957	Moore, G.E., Sandberg, A.A. u. Schubarg, J.R.	Armvenenblut	(L) 132	in einem Fall 42
13. 1958	Sandberg, A.A. u. Mitarb.	regionäres Blut	55	40
14. 1958	Pruitt, J.C. u. Mitarb.	Armvenenblut	179	52
15. 1958	Roberts, St. u. Mitarb.	Armvenenblut	109	55
16. 1958	Whang, J.	Armvenenblut	305	9
17. 1958	Langsten, H.T. u. Mitarb.	Armvenenblut	100	39
18. 1958	Peckholz, F. u. Böhm, V.	Armvenenblut	92	16
		regionäres Blut	66	29
		Armvenenblut	26	0
		regionäres Blut	26	27
		Spülflüssigkeit von Lungen Bronch.-Ca.-Pat.	(F) 15	80
		beide Herzkammern	(F) 74	14

21.	1959	Fletcher, W.S. u. Stewart, F.W.	regionäres Blut Armenvenenblut	(B)	177 24	177 24	50 17
22.	1959	Diddle u. Mitarb.	regionäres Blut Armenvenenblut	(B)	38 13	38 13	39 0
23.	1959	Malmgren, R.A. u. J.F. Potter	regionäres Blut peripheres Blut	(L)	13 121	13 121	62 28
24.	1959	Reiss, R.	regionäres Blut	(L)	38	38	55
25.	1960	Spriggs, A.J.	regionäres Blut Armenvenenblut u. regionäres Blut	(L)	6 100 30	6 100 30	50 7 7
26.	1960	Baldus, F.	Armenvenenblut	(B)	136	136	33
27.	1960	Soost, H.J.	Armenvenenblut u. regionäres Blut				
28.	1961	Fleischer, J.	Armenvenenblut				
29.	1961	Roberts, St. u. W.H. Cole	Armenvenenblut u. regionäres Blut				
30.	1961	Chone, B. u. J. Becker	Armenvenenblut		200	200	24
31.	1961	Loebell, G.	peripheres Blut		91	91	2
32.	1961	Ikke, A.	Vena cava		30	30	0
33.	1962	Nedelko, B., W.H. Christopherson u. J.S. Harter	Armenvenenblut		103	103	22
34.	1962	Pruitt, J.C. u. Mitarb.	peripheres Blut		547	547	30
35.	1962	Wüst, G. u. G. Birk	regionäres Blut		130	130	29
36.	1962	Moore, G.E. u. Mitarb.	Armenvenenblut		70	70	10
37.	1963	Herbeuval, R., H. Herbeuval u. J. Duheille	peripheres Blut peripheres Blut regionäres Blut	(Ch)	173 240 48	173 240 48	33 6 22

+ = im Blut von Sarkom-Mäusen

Zitiert aus den Arbeiten von:

B = Baldus, F. L = Ludwig, J. F = Fleischer, J. Ch = Chone, B.

DISKUSSION

Nach dem oben Erwähnten läßt sich über die Fluorochromierung mit Acridinorange folgendes sagen:

Daß auch die Acridinorange-Färbemethode eine Diagnose auf Grund der Färbegualitäten allein nicht erlaubt (die morphologischen Kriterien müssen berücksichtigt werden (13, 25, 50)), ist nicht nur eine Schwäche dieser Methode, sondern ist allen anderen Färbeverfahren, die auf dem Nachweis der RNS in der Zelle beruhen, gemein.

Die Tatsache, daß es gutartige Zellen mit hohem RNS-Gehalt und bestimmte bösartige mit geringem Gehalt an RNS gibt, ist lediglich ein Zeichen für die Stoffwechselaktivität zum Zeitpunkt der Untersuchung. So unterscheidet auch CASPERSON (9) drei Zustände von Krebszellen im infiltrierenden Tumorgewebe auf Grund des Nukleinsäuregehaltes:

1. A-Zellen; sie haben einen hohen Gehalt an Nukleinsäure infolge der erhöhten Stoffwechselaktivität.
2. B-Zellen mit geringerem Nukleinsäuregehalt infolge abklingender Stoffwechselaktivität.
3. Nekrotische Tumorzellen mit durch Nekrobiose vermindertem Gehalt an Nukleinsäure.

Daher ist auch das Problem, Krebszellen mit gutartigen, stoffwechselaktiven Zellen des Blutes zu verwechseln, kein Charakteristikum der Acridinorange-Färbemethode allein, sondern wie schon gesagt, besteht diese Schwierigkeit für alle Färbemethoden, die auf dem zytochemischen Nachweis der RNS beruhen. Während bei der Acridinorange-Methode mehr falsche positive Beurteilungen zu erwarten sind (6), gibt es bei der Methode nach PAPANICOLAOU mehr falsche negative Beurteilungen. Jedoch liegen alle falschen Beurteilungen, positive bei der einen und negative bei der anderen Methode, innerhalb der Fehlergrenze von $\pm 5\%$, die bei beiden vorausgesetzt werden kann.

Das "Warnzeichen" nach v. BERTALANFFY und BERTALANFFY, womit die hellorange oder flammend rote Fluoreszenz der Zellen mit hohem RNS-Gehalt gemeint ist, sollte nicht dahingehend interpretiert werden, daß es nur bei positivem Tumorzellbefund vorhanden sein kann, aber es sollte der Hinweis für eine sehr genaue Untersuchung sein. Dagegen kann bei nicht vorhandenem Warnzeichen nicht dafür garantiert werden, daß keine Tumorzellen vorhanden sind, sondern daß die Häufigkeit im Auftreten von Tumorzellen bei negativem Warnzeichen relativ gering ist.

Dessen ungeachtet wurde in unseren und in anderen Untersuchungen gezeigt, daß, wenn Tumorzellen in einer Blutprobe vorhanden sind, diese quantitativ und qualitativ getrennt werden und mit Hilfe einer der angegebenen Färbemethoden diagnostiziert werden können.

Ob Tumorzellen im Blut tumorkranker oder tumorverdächtiger Patienten nachgewiesen werden können, liegt daher nicht an der Untersuchungsmethode, sondern an einer Vielzahl bekannter Faktoren (9, 32, 52), die sich der Kontrolle des Untersuchers entziehen. Unter diesen Faktoren ist die Konzentration der Tumorzellen in der Blutprobe einer der wichtigsten. Ein Vorversuch zeigte, daß eine Mindestkonzentration von 10 Zellen/mm³ vorhanden sein muß, damit Tumorzellen im direkten Blutausschlag nachgewiesen werden können.

Die Unregelmäßigkeit, mit der Tumorzellen in den Blutkreislauf abgegeben werden und die Schnelligkeit, mit der sie entfernt oder zerstört werden, sind Faktoren (28, 34), die mit der Art, dem Entwicklungsstadium und dem Sitz des Tumors variieren, ebenso wie mit dem Allgemeinbefinden des Patienten. MADDEN und MALMGREEN haben im Mäuseversuch gezeigt, daß Tumorzellen, die in dem Kreislauf gesunder Mäuse injiziert werden, innerhalb von Minuten nicht mehr nachweisbar waren (34). Nur nachdem den Tieren 500 000 Tumorzellen injiziert worden waren (das entspricht einer Konzentration von etwa 250 Zellen/mm³), konnten 3 Minuten nach der Injektion welche nachgewiesen werden, während 10 Minuten nach der Injektion praktisch alle fremden Zellen aus dem Kreislauf verschwunden waren. Das erklärt die Tatsache, daß so wenig Tumorzellen in den Blutproben tumorkranker Patienten gefunden werden (38, 43).

Das Schicksal dieser Zellen und ihre Fähigkeit, Metastasen bilden zu können, interessiert hier nicht besonders; wichtig erscheint die Tatsache, daß die Konzentration von Tumorzellen im Blut tumorkranker Patienten sehr stark variiert (39) und einen sehr hohen Unsicherheitsfaktor hinterläßt, den auch die beste Untersuchungsmethode nicht kompensieren kann.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde eine kritische Bewertung der Acridihorange-Färbemethode bei der Suche nach Tumorzellen im strömenden Blut vorgenommen.

Die Untersuchungen erstreckten sich auf das Ehrlich-Aszites-Karzinom der Mäuse, vermischt mit Rattenblut, Pleura- und Abdominalergüsse von Tumorpatienten, vermischt mit dem Blut der jeweiligen Patienten und Blut von Tumorpatienten.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Fluorochromierung mit Acridinorange sehr zuverlässig bei der Entdeckung von Tumorzellen ist, und daß die Schwierigkeit, Tumorzellen im strömenden Blut zu finden, nicht von dieser Untersuchungstechnik, sondern von einer Reihe bekannter Faktoren, die sich der Kontrolle des Untersuchers entziehen, abhängig ist.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Atkin, N.B. and B.M. Richards:
Desoxyribonucleic acid in Human tumours as measured by microspectrophotometry of Feulgen stain: a comparison of arising at different sites.
Brit.J.Canc. 10 (1956), S.769
2. Baldus, F.:
Über den Nachweis von Tumorzellen im strömenden Blut.
Klinische Wochenschrift 17 (1960), S.845
3. Bertalanffy, L. von:
Eine fluoreszenzmikroskopische Schnellmethode zur Diagnose des gynäkologischen Karzinoms.
Klinische Wochenschrift 37 (1959), S.469
4. Bertalanffy, L. von und F.D. Bertalanffy:
Die Fluoreszenzmethode in der exfoliativen Zytologie, besonders der Diagnose des Lungenkrebses.
Naturwiss. 47 (1960), S.165
5. Bertalanffy, F.D.:
Cytological Cancer Diagnosis in Gynecology by Fluorescence Microscopy.
Modern Medicine of Canada 12 (1960), S.55
6. Bertalanffy, L. von und F.D. Bertalanffy:
Fluoreszenzmethode in der Zytodiagnostik des gynäkologischen Karzinoms.
Die Medizinische Welt 35 (1961), S.1
7. Bertalanffy, F.D.:
Zur Zytodiagnostik des Krebses: Fluoreszenzmikroskopie nach Acridinorange-Färbung.
Triangel 3 (1961), S.152
8. Cain, H.:
Hämatogene Geschwulstausbreitung in der Lunge unter besonderer Berücksichtigung sogenannter regelwidriger Fälle.
Zeitschrift für Krebsforschung 62 (1958), S.323
9. Casperson, T.:
Cell Growth and Cell Function.
Norton-Verlag, New York 1960

10. Cerecedo, L.R., E. Bresnick, H. Hochstrasser, Belen, L., Rodriguez, E.T. Sehubert, E., J. Singer and V. S. Palladino:
Chemical changes in the Lungs of tumourbearing rats.
Biochem. et biophys. Acta (Amsterdam) 24 (1957), S. 58
11. Choné, B. und J. Becker:
Klinische Ergebnisse der Tumorzell Diagnostik im peripheren Blut.
Strahlentherapie 115 (1961), S. 404
12. Choné, B.:
Dreidimensionale Tumordiagnostik.
Münch. Med. Wschr. 14 (1962), S. 621
13. Dart, L.H. and Turner, T.R.:
Fluorescence microscopy of exfoliative cytology.
Report of Acridin-Orange examination of 5491 cases with comparison by the Papanicolaou technique.
Labor. Invest. 8 (1959), S. 1513
14. Dubrausky, V. und J. Jäger:
Acridinorange-Fluorochromierung in der vaginalen Zyklusdiagnostik.
Die Medizinische Welt 18 (1962), S. 621
15. Eichner, D.:
Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen am Duodenalepithel der weißen Maus.
Zeitschrift für Zellforschung 49 (1959), S. 418
16. Eichner, D.:
Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen am Pigmentepithel der Rindernetzhaut.
Zeitschrift für Zellforschung 49 (1959), S. 655
17. Engell, H. C.:
Cancer Cells in Circulating Blood.
Acta chirurg. Skandin. Supp. 201 (1955)
18. Flaschenträger, B. und E. Lehnartz:
Biochemie der Nukleinsäuren im Tumorgewebe.
Physiologische Chemie (Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg)
II. Band, 2. Teil/c. 1959
19. Fleischer, J.:
Tumorzellen im peripheren Blut und Sternalmark.
Die Medizinische Welt, I. Band (1961), S. 422

20. Frey, E.:
Zur Frage der freien Geschwulstzellen im peripheren Blut.
Strahlentherapie 114 (1961), S.622
21. Graeber, F.:
Nachweis von Tumorzellen im strömenden Blut.
Therapeutische Berichte ("Bayer", Leverkusen), 5 (1960), S.247
22. Graeber, F.:
Nachweis von Tumorzellen im strömenden Blut.
Krebsarzt 11 (1961), S.473
23. Graeber, F.:
Die Methodik der zytologischen Krebsdiagnostik, insbesondere des Nachweises von Tumorzellen aus dem strömenden Blut des Menschen.
Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, 45.Tagung:
23.-27.Mai 1961, Münster
24. Graeber, F., H.Gastpar und A.Herrmann:
Der Nachweis von Tumorzellen im strömenden Blut.
Zeitschrift wie oben, Bd.176 (1960), S.802
25. Grunze, H.:
Tumorzellen, Phagozyten und Speicherzellen in Punkatzen. Handbuch der gesamten Haematologie (Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien) 1957, I.Band, 1.Teil, S.333
26. Hamperl, H. und N.Schümmelfeder:
Über Fluoreszenzmikroskopie.
CIBA-Symposium 2 (1961), S.50
27. Hawtrey, A.O.:
Fractionation of cell types in Ehrlich ascites fluid by sucrose gradient centrifugation.
Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 99 (1958), S.28
28. Hengesh, J.W., E.A.McGrew and S.Nanos:
Malignant cells in the peripheral blood of experimental animals.
Acta cytologica (Philadelphia) 6 (1962), S.143
29. Herbeuval, R., H.Herbeuval und J.Duheille:
Eine Methode für den Nachweis von Krebszellen im Blut.
Die Leukozytenkonzentration.
Triangel 2 (1963), S.47

30. Herrmann, A.:
Klinische und experimentelle Untersuchungen über den Nachweis der Tumorzellen in strömendem Blut.
Archiv für Ohren-Nasen- und Kehlkopfheilkunde, Bd.176 (1960), S.536
31. Herrmann, A.:
Der Tumorzellnachweis im Blut und seine Bedeutung für die Klinik.
Zeitschrift wie oben, Band 178 (1961), S.263
32. Loebell, G.:
Instrumentelle Tumorzellverschleppung bei Operationen.
Archiv für Ohren-Nasen- und Kehlkopfheilkunde, Bd.178 (1961), S.268
33. Ludwig, J.:
Tumorzellen in Blut und Lymphe.
Oncologia 14 (1961), S.174
34. Madden, R.E. and Malmgren, R.A.:
Quantitative Studies on Circulating Cancer Cells in the Mouse.
Cancer Research 1 (1962), S.62
35. Moore, S., D.E.R. Townsend, J.D. Palmer and H. Sigmann:
The problem of tumour cells in the peripheral blood.
Canad. J. Surg. 5 (1962), S.366
36. Nedelko, B., W.M. Christopherson and J.S. Harter:
Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut.
Acta cytologica 5 (1961), S.203
37. Potter, R. van:
The biochemical approach to the cancer problem.
Fed. Proc. 17 (1958), S.691
38. Pruitt, J.C., A.W. Hilberg, R.P. Moorehead and H.F. Mengoli:
Quantitative studies of malignant cells in local and peripheral circulating blood.
Surgery, Gynecology & Obstetrics Febr. 1962, S.179
39. Roberts, S.S. and W.H. Cole:
Cancer cells in the circulating blood.
Seminar International 1 (1961), S.2
40. Salfelder, K.:
Was leistet das Phasenkontrastverfahren nach Zernicke für die zytologische Tumordiagnostik? Zeitschrift für Krebsforschung 57 (1951), S.517

41. Sandberg, A.A. and G.E. Moore:
Examination of Blood for tumor cells.
Journal of the Nat. Canc. Inst. 1 (1957), S.1
42. Sandritter, W.:
Die Frühdiagnose des Krebses in der Pathologischen Anatomie.
Die Medizinische Welt 8 (1962), S.403
43. Soost, H.J.:
Zum Nachweis von Tumorzellen im Blut beim Genitalkarzinom der Frau.
Vorgetragen auf dem Kolloquium der Medizinischen Fakultät der Universität München am 20.7.1960
44. Steiner, R.F. and R.F. Beers:
Polynucleotides V. Titration and spectrophotometric studies upon the interaction of synthetic polynucleotides with various dyes.
Arch. Biochem. 81 (1959), S.75
45. Sträuli, P.:
Erreichte und erstrebte Ziele der Metastasenforschung.
Oncologia 15 (1952), S.123
46. Schümmelfeder, N.:
Bausteinanalyse von Geschwulstzellen.
Zeitschrift für Krebsforschung 58 (1962), S.666
47. Schümmelfeder, N.:
Die Fluorochromierung tierischer Zellen mit Acridinorange.
Naturwiss. 346 (1948), S.
48. Schümmelfeder, N.:
Über Beziehungen zwischen Stoffwechselaktivität und Acridinorange-speicherung von Zellen.
Naturwiss. 58 (1949)
49. Schümmelfeder, N.:
Die Fluorochromierung des lebenden, überlebenden und toten Protoplasmas mit dem basischen Farbstoff Acridinorange und ihre Beziehung zur Stoffwechselaktivität der Zelle.
Virchows Archiv für path. Anatomie 318 (1950), S.119

50. Schümmelfeder, N., G.Kern, E.Kern-Bontke:
Die Acridinorange-Fluorochromierung in der gynäkologischen Zytodiagnostik bösartiger Tumoren.
Mitteilungsdienst der G.B.K. 7 (1962), S.482
51. Wellmann, K.F.:
Kritische Bemerkungen zur Acridinorange-Fluorochromierung in der zytologischen Krebsdiagnostik.
Die Medizinische Welt 2 (1962), S.2100
52. Wessel, W.:
Elektronenmikroskopische Beobachtungen von Zellveränderungen nach mehrtägiger Unterkühlung an Aszitestumorzellen, sowie Vergleich eines Asziteskarzinoms mit einem Aszites Sarkom.
Zeitschrift für Krebsforschung 62 (1959), S.675
53. Whang, J.:
Über Krebszellen im Blut und Knochenmark.
Zeitschrift für Krebsforschung 62 (1958), S.397
54. Wittekind, D.:
Über Entstehung, Morphologie und gegenseitige Beziehungen intraplasmatischer Vakuolenbildungen in lebenden Tumorzellen aus Ergüssen seröser Höhlen. Fluoreszenz- und phasenkontrastmikroskopische Untersuchung.
Virchows Archiv für path.Anatomie 333 (1960), S.311
55. Wüst, G. und G.Birk:
Nachweis und Häufigkeit von Geschwulstzellen im strömenden Blut des Menschen.
Die Medizinische Welt 17 (1963), S.922
56. Yoshida, T.:
Studien über das Aszites-Hepatom.
Virchows Archiv für path.Anatomie 330 (1957), S.85

An dieser Stelle möchte ich

Herrn Professor Dr.med. L. Diethelm

für dieses Thema und das Interesse, das er meiner Arbeit stets entgegenbrachte, sowie für den Arbeitsplatz in seinem Institut herzlich danken.

Herrn Dr.med. A. C. Amoroso danke ich für die ständige Überwachung meiner Arbeit und die guten Ratschläge, und Frau R. Amoroso für ihre Hilfsbereitschaft.

LEBENS LAUF

Ich wurde am 27. Mai 1938 in Budapest/Ungarn als Sohn von László Bölcskei und seiner Ehefrau Margit, geborene Deszberg, geboren.

Die Volksschule und die Höhere Schule besuchte ich in Budapest. 1956 bestand ich am Gymnasium "Kölcsey" das Abitur mit Auszeichnung.

Im September 1956 immatrikulierte ich mich an der Medizinischen Fakultät der Universität Budapest.

Am 28. November 1956 mußte ich wegen Beteiligung am Aufstand vom Oktober 1956 aus Ungarn flüchten und erhielt am 16. Dezember 1956 Asyl in der Bundesrepublik Deutschland.

Die ärztliche Vorprüfung bestand ich im April 1961 in Erlangen. Seit dem Sommersemester 1961 studiere ich in Mainz. Ich habe das medizinische Staatsexamen am 27. 2. 1965 mit der Note "gut" bestanden.

